



Scuola Superiore
Sant'Anna
di Studi Universitari e di Perfezionamento

Corso di BIOTECNOLOGIE VEGETALI

Biotechnologie applicate al diserbo

A cura di

Pierdomenico Perata & Elena Loreti

RESISTENZA A DISERBANTI

Il diserbo



- Le erbe infestanti riducono fortemente le produzioni vegetali
- Negli USA vengono spesi 10 miliardi di \$ ogni anno per il diserbo

Il diserbo

	•A mano		•Sommersione
	•Lavorazione meccanica del suolo		•Fuoco
	•Chimico (erbicidi)		•Pacciamatura

Il diserbo chimico: vantaggi

- Possibilità di controllo di molte specie infestanti
- Alcuni diserbanti hanno azione sistemica



- Alcuni sono selettivi, innoqui per le specie coltivate
- I diserbanti possono essere applicati rapidamente →
- Consentono minori lavorazioni del suolo e quindi riducono i fenomeni erosivi



Il diserbo chimico: svantaggi

- Possono essere tossici per gli uomini ed altri viventi
- Possono influenzare negativamente l'ecosistema del suolo
- Possono essere trasportati dalle acque di superficie o contaminare le falde acquifere
- Possono persistere nel terreno e danneggiare le colture
- Se impropriamente usati possono danneggiare le colture
- Possono indurre lo sviluppo di specie vegetali resistenti agli erbicidi stessi
- La loro efficacia induce gli agricoltori a preferirli ad altre tecniche
- Il loro uso induce all'abbandono delle rotazioni colturali, con maggiore diffusione di insetti e patologie specie-specifiche

Gli erbicidi: caratteristiche

- Sostanze chimiche che interferiscono con processi vitali della pianta
- Fitotossici a bassa dose
- Usualmente 1-2 Kg per ettaro

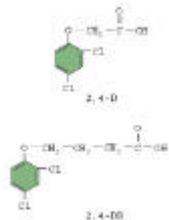
1. Pochi agiscono per contatto
2. Traslocati per via xilematica
3. Traslocati per via xilematica e floematica: **SISTEMICI**
 - Efficaci sulle specie perenni, perchè causano morte delle radici

Gli erbicidi: meccanismo di azione

- La maggior parte si legano, e quindi bloccano, l'attività di specifici enzimi
- Molte attività enzimatiche inibite dagli erbicidi sono a localizzazione plastidiale (fotosintesi, sintesi aminoacidi aromatici)
- Per questo gli erbicidi sono scarsamente tossici per l'uomo, molto meno ad es. degli insetticidi
 - DL50 erbicidi: 10-400 g/uomo
 - DL50 insetticidi: 0.32-96 g/uomo

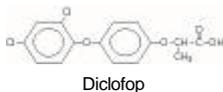
Gli erbicidi: specificità di azione

- Alcune molecole, quale il 2,4DB, non sono di per se fitotossiche, ma alcune dicotiledoni lo convertono in 2,4D (fitotossico). Alcune leguminose (erba medica e altri legumi) non attuano la conversione: il 2,4DB è quindi utilizzabile quale erbicida selettivo per queste colture
- Alcune specie sono resistenti agli erbicidi perché in grado di detossificare metabolicamente l'erbicida più velocemente delle specie suscettibili



Gli erbicidi: specificità di azione

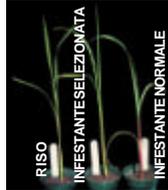
- Gli erbicidi a base di **aryloxyphenoxypropionate** (Diclofop) agiscono inibendo l'enzima acetyl-CoA carbossilasi (primo passaggio nella sintesi degli acidi grassi). Le **monocotiledoni** possiedono solo 1 gene nucleare che codifica per l'enzima, ed è inibito dall'erbicida: sono uccise dall'erbicida. Le **dicotiledoni** possiedono invece due geni, 1 nucleare ed uno plastidiale (quest'ultimo NON inibito dall'erbicida). Le dicotiledoni sono quindi resistenti all'erbicida.



Gli erbicidi: sviluppo di resistenza

- L'uso di un particolare diserbante causa variazione nella flora infestante:
- L'impiego di diserbanti specifici per le dicotiledoni aumenta il numero di specie infestanti monocotiledoni

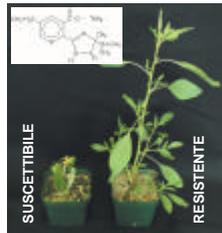
•Anche l'uso del diserbo manuale causa selezione di varianti "resistenti": il diserbo a mano del riso causa la selezione di Echinocloa con aspetto piu' simile al riso



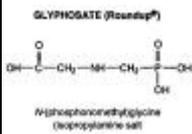
Gli erbicidi: sviluppo di resistenza

- L'uso di un particolare diserbante causa la selezione di mutanti naturali resistenti all'erbicida stesso
- L'uso di IMAZETHAPYR porta alla selezione di mutanti resistenti: la resistenza è dovuta ad una mutazione nel gene che codifica per la acetolattato-sintasi, bersaglio dell'erbicida

Distribution of ALS Resistant Species



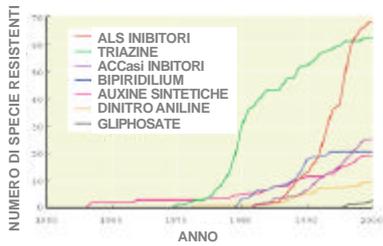
Gli erbicidi: sviluppo di resistenza



Distribution of Glyphosate Resistant Species



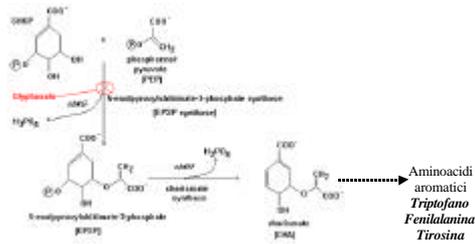
Gli erbicidi: sviluppo di resistenza



Per evitare la selezione di specie resistenti è consigliabile impiegare diverse tipologie di diserbanti

Il Glyphosate: meccanismo di azione

- Il GLYPHOSATE agisce inibendo l'enzima EPSP sintasi
- L'EPSP sintasi è essenziale per la sintesi degli aminoacidi aromatici
- La sintesi degli aa aromatici avviene nel cloroplasto



Il Glyphosate: meccanismo di azione

Il GLYPHOSATE non è selettivo



- Diserbante totale
- Non selettivo
- Traslocato all'apparato ipogeo
- Non lascia residui nel terreno

Biotecnologie applicate al diserbo

Il GLYPHOSATE non è selettivo;
creazione di piante GM resistenti al glyphosate



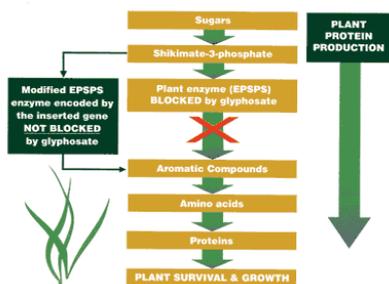
Il RoundUp è prodotto da MONSANTO



MONSANTO ha sviluppato una linea di sementi Biotec in grado di tollerare il RoundUp: **piante Roundup-READY**

Biotecnologie applicate al diserbo

Tecnologia Roundup-READY



Biotecnologie applicate al diserbo

Tecnologia Roundup-READY

Soia Round-up ready:
Sistema di trasformazione: **BIOLISTICO**
Gene di selezione: GUS



- LA SINTESI DEGLI aa AROMATICI AVVIENE NEL CLOROPLASTO
- L'ENZIMA EPSPS E' CODIFICATO DAL GENOMA NUCLEARE, MA LA PROTEINA VIENE POI "INVIATA" AL CLOROPLASTO
- IL RICONOSCIMENTO DELLA PROTEINA AVVIENE GRAZIE ALLA PRESENZA DI UN BREVE PEPTIDE CHE VIENE RICONOSCIUTO A LIVELLO DI MEMBRANA DEL CLOROPLASTO

Biotecnologie applicate al diserbo

Tecnologia Roundup-READY



Soia convenzionale



Soia Roundup-ready

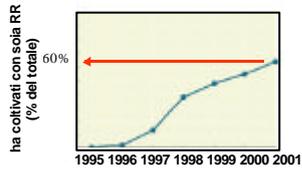
Biotecnologie applicate al diserbo

Tecnologia Roundup-READY

VANTAGGI

L'uso del glyphosate su colture GM consente di limitare le lavorazioni del terreno e quindi di limitarne l'erosione

La selezione di specie resistenti è scarsa con l'uso del glyphosate rispetto ad altri erbicidi



Biotecnologie applicate al diserbo

Tecnologia Roundup-READY

RISCHI / SVANTAGGI

Gene-flow: La soia coltivata (Glycine max) non si impollina con specie spontanee negli USA e nel Canada; E' possibile l'incrocio con la soia selvatica Glycine soja, ma quest'ultima cresce solo in Cina, Corea, Giappone, Russia

- **Rischio di uso eccessivo di diserbanti**
- Gli agricoltori usano un solo erbicida (RoundUP) e questo puo' portare piu' rapidamente allo sviluppo di malerbe resistenti
- Le stesse specie coltivate possono divenire infestanti: impossibilità di rotazione soiaRR/maisRR



Biotecnologie applicate al diserbo

Tecnologia Roundup-READY

Sostanziale Equivalenza

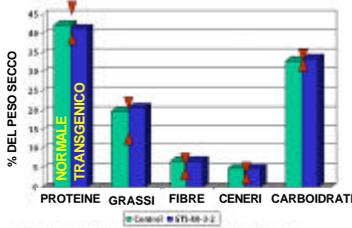
Il principio della sostanziale equivalenza si applica agli OGM che non differiscono per caratteristiche nutrizionali, organolettiche e tossicologiche, dagli ibridi ottenuti con le tecniche classiche di selezione

Principio di Precauzione

"un approccio alla gestione del rischio che si applica in circostanze di incertezza scientifica e che riflette l'esigenza di intraprendere delle azioni a fronte di un rischio potenzialmente serio senza attendere i risultati della ricerca scientifica".

Biotecnologie applicate al diserbo

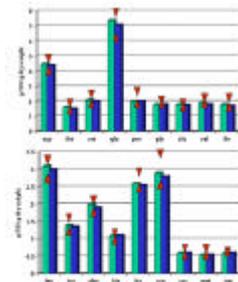
Soia Roundup-READY
Sostanziale Equivalenza



Proximate analysis of soybean seeds. Bars represent the means of each component from four field sites in 1991, and the triangles represent the high and low values reported in the literature for each respective component.

Biotecnologie applicate al diserbo

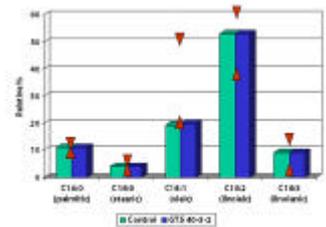
Soia Roundup-READY
Sostanziale Equivalenza



Amino acid analysis of soybean seeds. STI-49-3-1 represents the mean concentration of individual amino acids from 16 samples from eight field sites during 1991. The triangles represent the high and low values reported in the literature. Soybean transgenic seeds were cultivated for 100 days in a field with 100 g protein to g amino acid / 100 g sample by using the mean protein concentration of the seeds analyzed. All data.

Biotecnologie applicate al diserbo

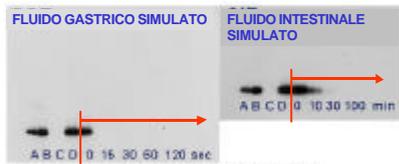
Soia **Roundup-READY**
Sostanziale Equivalenza



Fatty acid analysis of soybean seeds. Bars represent the mean levels of individual fatty acids determined from seeds from nine field trials in the United States in 1992. The triangles represent the high and low values from the literature for each respective fatty acid.

Biotecnologie applicate al diserbo

Tecnologia **Roundup-READY**
Digeribilità transgene



Western immunoblot analysis of purified CP4-EPSPS protein following incubation with simulated gastric fluid (SGF) or simulated intestinal fluid (SIF). Purified CP4-EPSPS (5, 10 ng; lanes A, B), digestive fluid with CP4-EPSPS (C), and CP4-EPSPS in buffer control (D).

Biotecnologie applicate al diserbo

Tecnologia **Roundup-READY**
Tossicità e allergenicità del transgene

La sequenza aminoacidica della CP4-EPSPS (transgene) è altamente simile alla EPSPS della pianta

La sequenza aminoacidica della CP4-EPSPS non ha alcuna omologia con proteine note ad azione tossica

Somministrazione di 0.5g/kg di peso non causa alcun effetto tossico: è una dose pari a 1300 volte l'ingestione attesa con consumo di soia GM

La sequenza aminoacidica della CP4-EPSPS non ha alcuna omologia con proteine note ad azione allergenica

	Oxynil herbicide tolerance Glyphosate herbicide tolerance Phosphinothricin (PPT) herbicide tolerance Imidazolinone herbicide tolerance.		Oxynil herbicide tolerance Sulfonylurea herbicide tolerance Glyphosate herbicide tolerance
Brassica napus COLZA	phosphinothricin (PPT) herbicide tolerance	Gossypium hirsutum L. Cotone	Glyphosate herbicide tolerance Phosphinothricin (PPT) herbicide tolerance
	Oxynil herbicide tolerance		Glyphosate herbicide tolerance Phosphinothricin (PPT) herbicide tolerance
Chichorium intybus CICORIA		Glycine max L. Sola	
	Glyphosate herbicide tolerance Imidazolinone herbicide tolerance. Phosphinothricin (PPT) herbicide tolerance Cyclohexanone herbicide tolerance		Glyphosate herbicide tolerance Phosphinothricin (PPT) herbicide tolerance
Zea mays L. Mais		Barbabettoia da zucchero	
	Phosphinothricin (PPT) herbicide tolerance Imidazolinone herbicide tolerance		Imidazolinone herbicide tolerance
Oryza sativa Riso		Grano	

Meccanismi d'azione e modifica genetica che induce la resistenza

1. By-pass dell'enzima target dell'erbicida Glyphosate
2. Inattivazione enzimatica del diserbante Glufosinate, Oxinil erbicidi
3. Mutazione dell'enzima target del diserbante Imidazolinones, Sethoxydim

Erbicida	Meccanismo di Azione	Transgene
Glyphosate	inibizione EPSPS impedisce sintesi aa aromat.	CP4-EPSPS insensibile al glifosate, ripristina sintesi aa aromatici
Glufosinate	analogo del glutammato inibisce glutammina sintetasi	phosphinothricin-N-acetyltransferase acetila il diserbante inattivandolo
Imidazolinones	inibizione acetolattato sintasi impedisce sintesi aa ramificati	mutagenesi per ottenere varianti ALS insensibili all'erbicida e selezione in vitro (Mais, colza)
Sulfonylurea	inibizione acetolattato sintasi impedisce sintesi aa ramificati	variante mutata di ALS da tabacco trasferita in cotone
Oxinil erbicidi	inibisce fotosintesi	bxn gene da <i>Klebsiella pneumoniae</i> codifica per l'enzima nitrilasi, che inattiva l'erbicida
Sethoxydim	AcetylCoA carboxylase Inibizione sintesi acidi grassi	mutagenesi per ottenere varianti ACCase insensibili all'erbicida e selezione in vitro
